مقـرر علـم الوراثـة

كلية طب الأسنان – جامعة قاسيون الخاصة

إعداد: د. لمى خضري

المحاضرة الثالثة

تضاعف الدنا DNA Replication

❖ التضاعف: Replication

- من مواصفات المادة الوراثية قدرتها على التضاعف.
- يجب أن يُنسخ الدنا DNA قبل انقسام الخلية في عملية تسمى تضاعف الدنا DNA Replication.
- إن تضاعف الدنا DNA هو أساس الوراثة (حتى تورث جميع الصفات الوراثية) وهي عملية أساسية ومهمة تحدث في جميع الخلايا وذلك لنسخ الدنا DNA ونقل المعلومات الوراثية للخلايا البنات (الناتجة عن الانقسام).

❖ متى يحدث تضاعف الدنا: DNA Replication

كلما احتاجت الخلايا أن تضاعف نفسها ، وذلك في الحالات التالية:

1. خلال النمو.
2. خلال التطور الجنيني.
3. لإصلاح الأنسجة المتضررة (بعد أذية أو جرح مثلاً).
4. لاستبدال الخلايا الميتة أو المتضررة.

يحدث هذا التضاعف مرة واحدة في دورة حياة الخلية وذلك قبل انقسام الخلية.

❖ فرضيات تضاعف الدنا: Hypotheses of DNA Replication

قبل التوصل لمعرفة الآلية الدقيقة لتضاعف الدنا DNA، وُضعت ثلاث نظريات لتفسير التضاعف:

1. النمط المحافظ: The Conservative Model

يتضاعف حلزون الدنا DNA بشكل كامل دون أن ينفصل طاقاه (سلسلتاه) عن بعضهما، حيث يحافظ على النمط الأبوي ويعطي نسخة ثانية عنه.

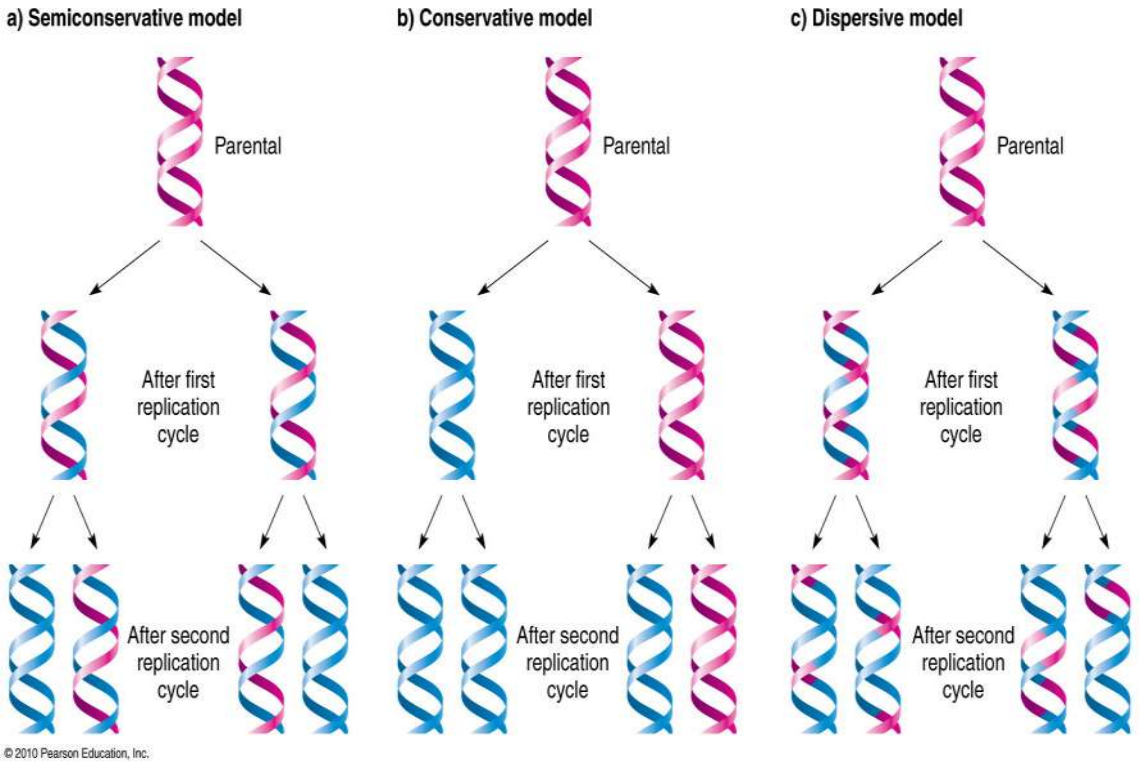
2. النمط نصف المحافظ: The Semiconservative Model

وهنا ينفصل طاقا الدنا DNA عن بعضهما ليكون كل منها قالباً لتشكيل سلسلة جديدة من الدنا، ليشكلا معاً (أي السلسلة القديمة والسلسلة الجديدة) حلزوناً Helix.

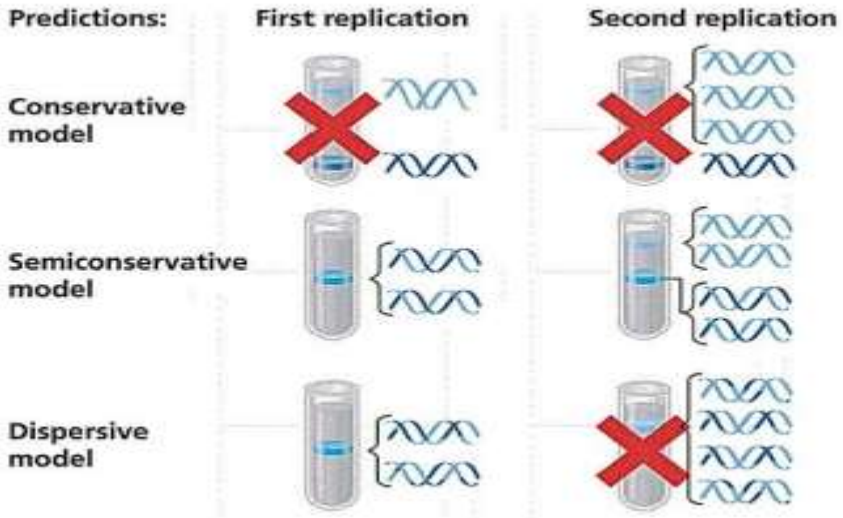
وفي النهاية يكون لدينا حلزونين من الدنا DNA.

3. النمط الانتثاري: The Dispersive Model

يتقطع طاقا دنا الأب ثم تتضاعف هذه القطع وتتوزع بشكل عشوائي في حلزونين بنتين، فيصبح كل طاق في كل من الحلزونين (الناتجين عن التضاعف) مؤلفاً من مزيج من نكليوتيدات من الدنا الأب ونكليوتيدات من دنا جديد.

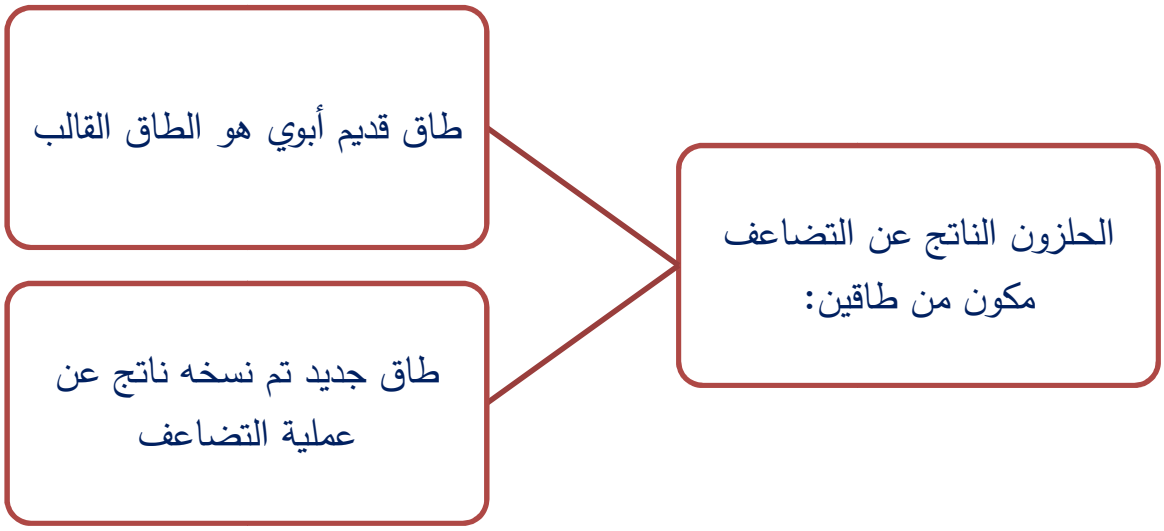


✓ في النهاية ، تم التوصل إلى حقيقة أن الدنا DNA يتضاعف وفق النمط نصف المحافظ.

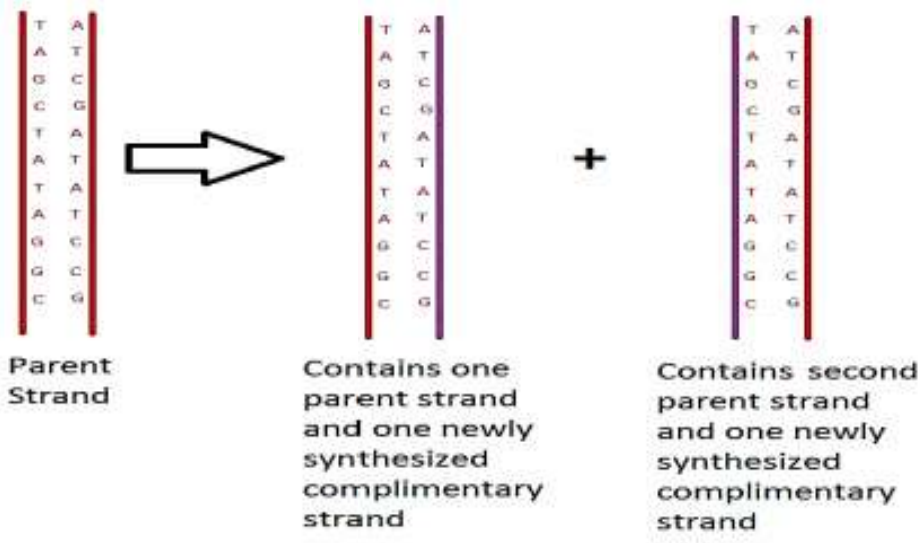


❖ حقيقة التضاعف: Replication Fact

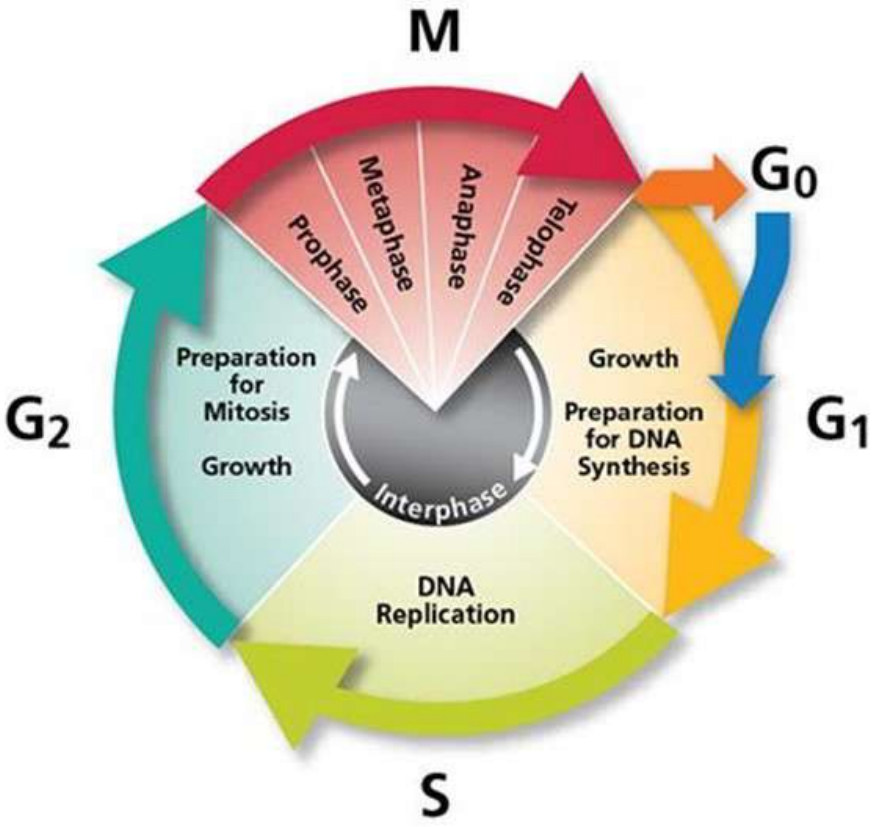
- يتضاعف الدنا DNA وفق النمط نصف المحافظ.
- لا يتلاشى طاقا حلزون الدنا DNA الأب، بل يُستخدم كل منهما كقالب يُنسخ عليه طاق جديد عن طريق اقتران الأسس الآزوتية لتشكيل حلزون دنا DNA جديد.



✓ إن الطاق القديم هو الذي يحدد تتالي الأسس الآزوتية في الطاق الجديد لأنه يُنتسخ منه، فتتالي الأسس في الطاق الجديد يعتمد على تتالي الأسس في الطاق القديم.



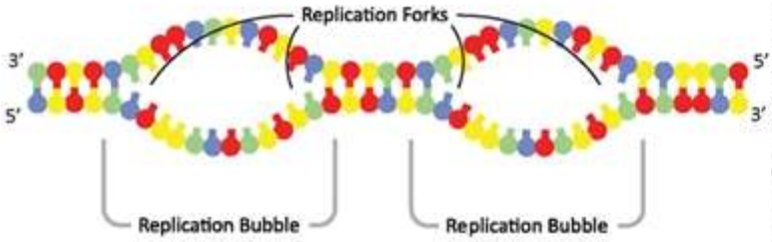
✓ يتم نسخ الدنا DNA خلال الطور S الذي يُسمى طور التركيب (التضاعف) Synthesis Phase من الطور البيني Interphase.

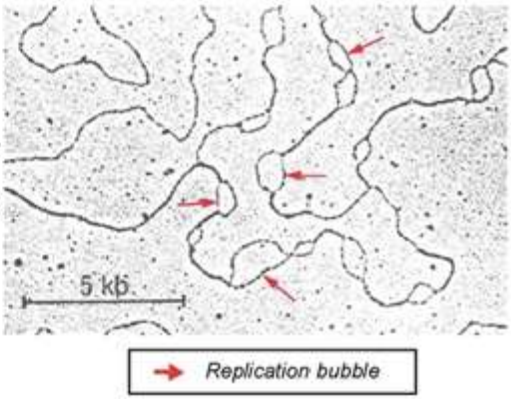


❖ منشأ التضاعف: Origin of Replication

- هو المكان الذي يبدأ فيه تضاعف الدنا DNA، أي المنطقة التي ينفصل فيها طاقا الدنا DNA حيث تتدمر الروابط الهيدروجينية الموجودة عن طريق أنزيم يسمى الهيليكاز Helicase.
- يدعى منشأ التضاعف أيضاً بفقاعة التضاعف Replication Bubbles.
- يسمى المكان الذي يحدث فيه انفصال طاقي الدنا والتضاعف بشوكة التضاعف.
- تملك كل فقاعة تضاعف واحدة، شوكتي تضاعف Replication Fork، وذلك في حقيقيات النوى وبدائيات النوى.
- نظراً لوجود أكثر من منشأ للتضاعف، فإن التضاعف يكون بشكل أجزاء (كما في الشكل)، وكل جزء يسمى "وحدة التضاعف Replication Unit" وتحوي على 100 kbp.

✓ تضمن عملية التضاعف أن الخلايا البنات ستحمل نفس المعلومات الوراثية مع بعضها البعض ومع الخلايا الأم في نفس الوقت.



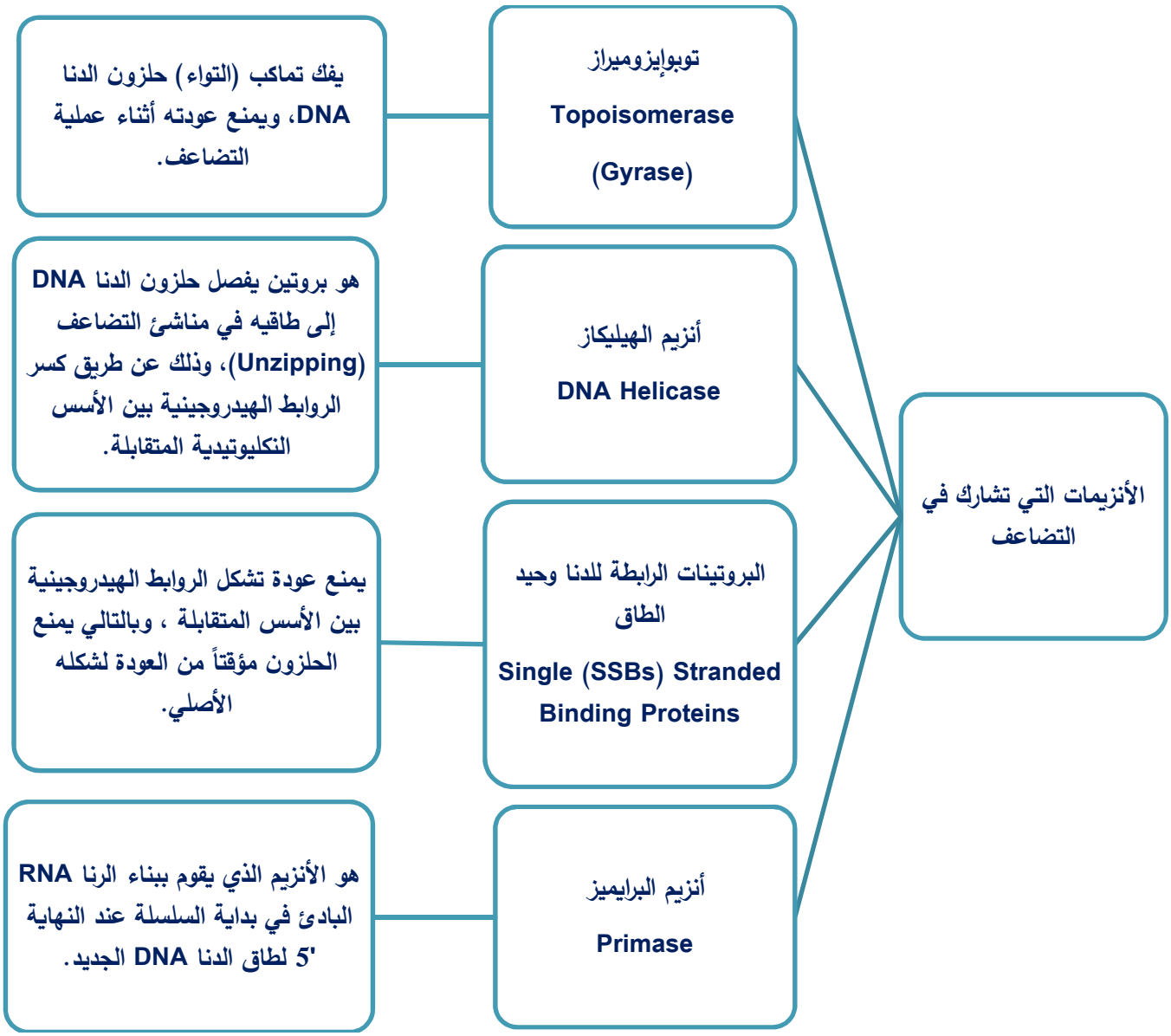


بدائيات النوى Prokaryotes	حقيقيات النوى Eukaryotes
تملك بدائيات النوى جزيء DNA حلقي واحد.	تملك حقيقيات النوى DNA طويل جداً ومستقيم.
تملك **منشئ تضاعف وحيد**، حيث يبدأ التضاعف في منطقة واحدة وتتشكل **فقاعة تضاعف واحدة فقط**.	تملك **عدة مناشئ للتضاعف**، حيث يحدث التضاعف بشكل متزامن في مئات المناطق وتتشكل **العديد من فقاعات التضاعف** على طول الحلزون المضاعف.
تحدث بشكل أبطئ من حقيقيات النوى لأنها تملك منشئ تضاعف وحيد.	تحدث بشكل أسرع من بدائيات النوى لتعدد مناشئ التضاعف.
يتشكل أثناء التضاعف في كل فقاعة **شوكتا التضاعف**، اللتان تتابعان مسيرهما باتجاهين مختلفين، ويلتقيان في بدائيات النوى فقط.	

❖ عوامل الانتساخ وأنزيمات التضاعف:

- وهي إشارات خلوية تسمى بالبروتينات المحرضة (المبادرة) Initiator Protein ، تتوضع على شريط الدنا فتعمل على جذب الأنزيمات التي تقوم بالتضاعف، حيث تتلقى الأمر من خارج الخلية عن طريق الهرمونات وغيرها...
- تكون عوامل الانتساخ قليلة الوجود في الخلايا الهاجعة مثل الخلايا العصبية حيث لا يحدث تضاعف.

✓ تكون عوامل الانتساخ موجودة بشكل كبير في الخلايا سريعة الانقسام، مثل خلايا الجلد.



❖ أنزيم بوليميراز الدنا 3 (DNA Polymerase):

- هو الأنزيم الذي يقوم بصف النكليوتيدات لتشكيل طاق الدنا DNA الجديد، وذلك حسب مبدأ التقابل مع الطاق القالب.
- حيث تكون هذه النكليوتيدات حرة في النواة أو الهيولى ، ويقوم هذا الأنزيم باختيار المناسب منها لعملية التضاعف.
- يحتاج الأمر أولاً إلى تسلسل نكليوتيدي ابتدائي (يمكن أن يكون RNA أو DNA) هو البادئ Primer، لبدء التوليف.
- إن أنزيم بوليميراز الدنا III لا يعمل إلا في اتجاه واحد، وذلك من 3’ → 5’.
- ونستنتج من ذلك:
  - يحدث التضاعف على الطاق القالب Template Strand والذي يكون اتجاهه 5’ → 3’.
  - يكون اتجاه الطاق الناتج 3’ → 5’ .
  - إن أساس عمل أنزيم بوليميراز الدنا III هو تجميع النكليوتيدات لتشكيل شريط الدنا DNA ، وهذا يكون بتشكيل روابط تكافؤية (استيرية) بين النكليوتيدات.

➢ يحتاج أنزيم بوليميراز الدنا III ليقوم بمهمته إلى طاقة ، هذه الطاقة يحصل عليها من مجموعة الفوسفات المرتبطة بالنكليوتيد، حيث يصرف جزيئتي فوسفات لكل أحادي monomere مضاف، فإذا كانت مجموعة الفوسفات ثلاثية يأخذ منها الطاقة ويحولها إلى ثنائية أو أحادية.

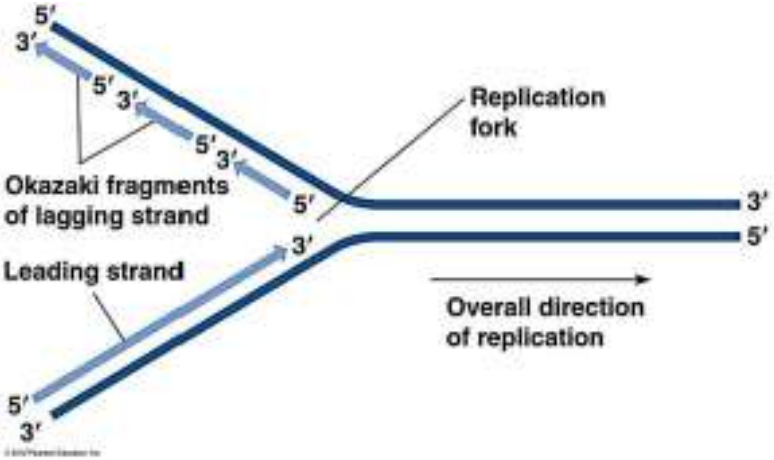
❖ السلسلة المتأخرة والسلسلة الموجّهة (المتقدمة) (Lagging and Leading Strands):

- إن أنزيم بوليميراز الدنا III لا يعمل إلا على الاتجاه 3’ → 5’ ، ولذلك يجب أن يكون اتجاه السلسلة الأساسية 5’ → 3’.
- وبالتالي، فإن التضاعف على إحدى السلسلتين ذات الاتجاه 5’ → 3’ يحدث بشكل طبيعي ، إلا أنه لا يمكن أن يحدث بهذا الشكل على السلسلة ذات الاتجاه 3’ → 5’.

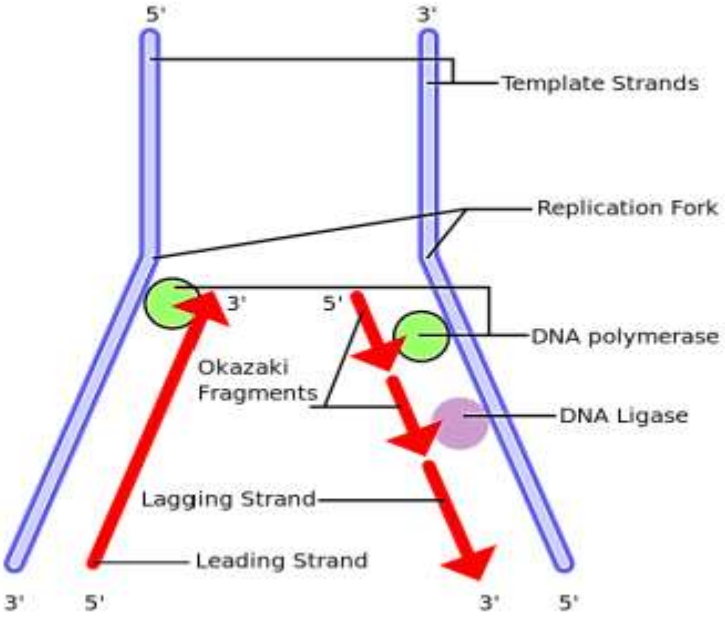
وهنا يظهر لدينا مفهومان:

1. السلسلة المُوجّهة: وهي السلسلة التي يتم توليفها بشكل مستمر وباتجاه التضاعف الأساسي، أي يكون توليفها معتمداً على السلسلة ذات الاتجاه 5’ → 3’ ، وبالتالي يكون اتجاهها(أي السلسلة الناتجة) من 3’ → 5’ (تكون بنفس اتجاه أنزيم الهيليكاز الذي تحدثنا عنه سابقاً).
2. السلسلة المتأخرة: يتم توليفها على شكل شُدفات قصيرة في الاتجاه المعاكس للتضاعف، أي يكون توليفها معتمداً على السلسلة ذات الاتجاه 3’ → 5’ لكن بعكس جهة التضاعف، وبشكل متقطع، وبالتالي يكون اتجاهها (أي السلسلة الناتجة) من 5’ → 3’ (كل قطعة يتم توليفها من 3’ → 5’) فتكون عملية التوليف بعكس اتجاه أنزيم الهيليكاز.

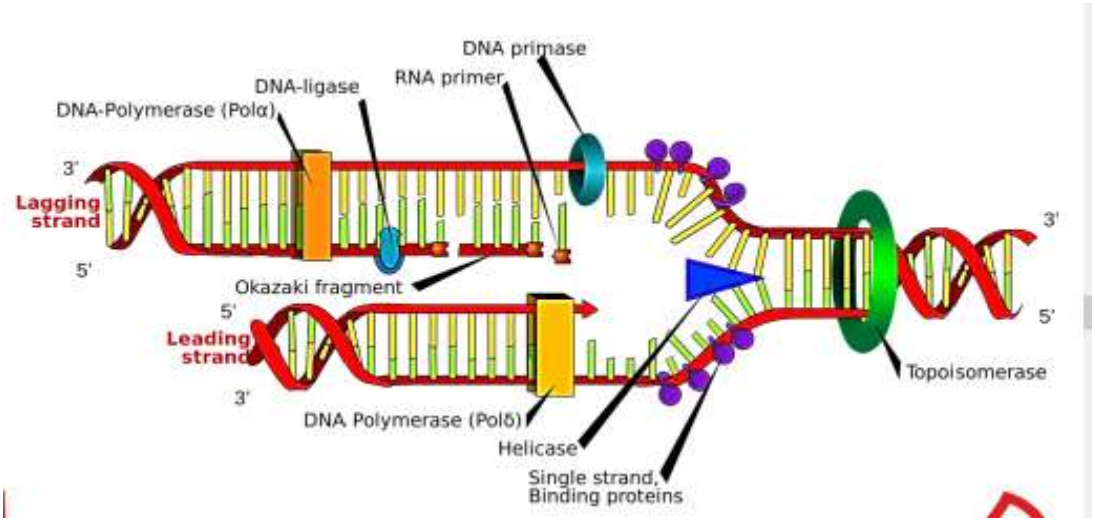
↩ هذه القطع أو الشُدفات تُسمى قطع أوكازاكي Okazaki Fragments.



↩ ونتيجة لذلك تكون السلسلة الناتجة متقطعة (غير مستمرة).



- تحتاج هذه السلسة المتأخرة إلى تسلسل ابتدائي عند كل قطعة أوكازاكي بشكل منفصل ، في حين أن هذا التسلسل الابتدائي واحد فقط عند توليف السلسلة الموجهة.



ملاحظة هامة:

- السلسلة الموجهة Leading Strand تحتاج إلى بادئ Primer واحد فقط.
- السلسلة المتأخرة Lagging Strand تحتاج إلى بادئ Primer لكل قطعة أوكازاكي.

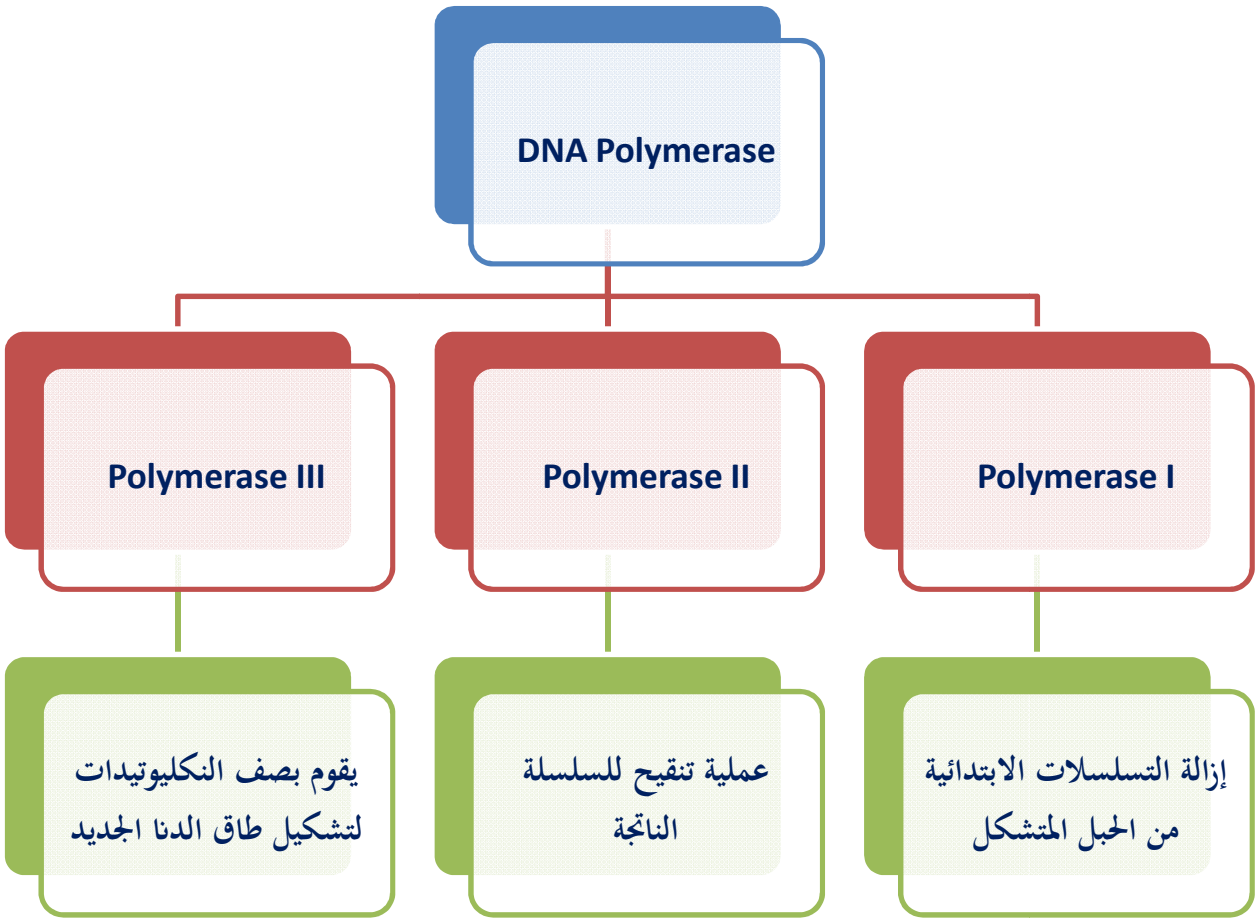
❖ إصلاح السلسلة المتأخرة الناتجة:

عندما ينتهي التضاعف تظهر مشكلة، وهي أن البداية يمكن أن تكون تسلسلات من الرنا RNA (Primers)، وبالتالي نحن بحاجة إلى إزالة هذه التسلسلات.

- وهنا يأتي أنزيم بوليميراز الدنا DNA Polymerase I I ويقوم بإزالة التسلسلات الابتدائية Primers ويضع مكانها نكليوتيدات من الدنا DNA.
- ثم يأتي أنزيم الـ DNA Ligase ليجمع هذه الشُدفات ويلحمها مع بعضها لتشكل سلسلة مستمرة. أي أنه يقوم بتشكيل روابط تكافؤية بين قطع أوكازاكي Okazagi والنكليوتيدات المُستبدل بها والتي حلّت محل البوادئ Primers.

❖ DNA Polymerase:

- بعد تشكيل سلسلة الدنا DNA وإزالة التسلسلات البادئة، يحتاج الأمر إلى عملية تنقيح للسلسلة الناتجة تلافياً لحدوث الطفرات. وهذا ما يؤمنه الأنزيم DNA Polymerase II والذي يقوم بعملية تنقيح Proofreading للسلسلة الناتجة وإزالة النكليوتيدات غير الصحيحة أو الطافرة.
- إن بوليميراز الدنا III لوحده يجعل احتمال الخطأ في تقابل الأسس 1/10000، ولكن بوجود البوليميراز II يكون احتمال الخطأ بالبليون فقط.



- إن عملية التضاعف عملية سريعة جداً، ففي بدائيات النوى يتم بلمرة 500 نكليوتيد في الثانية، في حين أن في حقيقيات النوى يكون 50 نكليوتيد في الثانية.
- بالرغم من ذلك، إلا أن عملية التضاعف –كما ذكرنا سابقاً– تكون في حقيقيات النوى أسرع منها في بدائيات النوى وذلك لأن في حقيقيات النوى يكون هناك أكثر من منشأ تضاعف (فقاعة تضاعف).

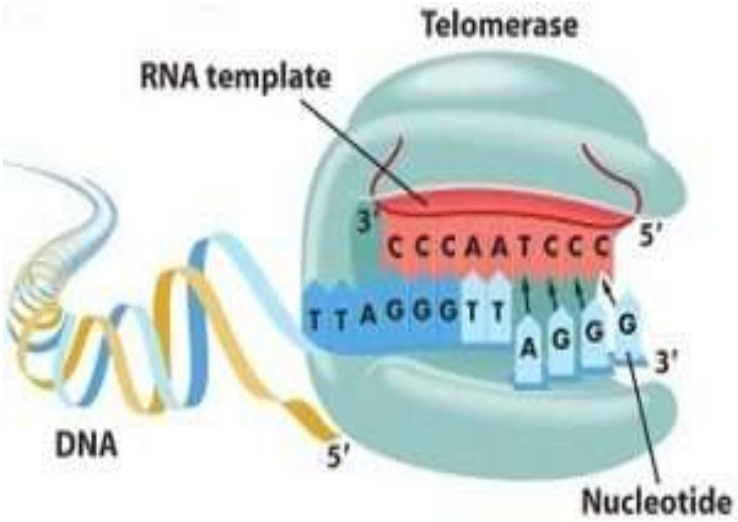
➢ مصطلحات هامة:

- Leading Strand.
- Lagging Strand.
- Okazaki Fragment.
- Helicase.
- DNA Polymerase III.
- RNA primer.

- تمتلك جميع أنزيمات الدنا بوليميراز فعالية Exonucleases (هي أنزيمات تقوم بشطر النكليوتيدات من نهاية Exo سلسلة عديدة النكليوتيدات، حيث تقوم بحلمهة الروابط الاسترية في إحدى نهايتي السلسلة 5’ أو 3’) حيث أنها قادرة على إزالة التسلسلات الخاطئة من النكليوتيدات في السلسلة الجديدة.

❖ نهاية الدنا DNA:

- يستطيع بوليميراز الدنا إضافة النكليوتيدات فقط بالاتجاه 3’ → 5’، وبالتالي عند إزالة التسلسل البدئي Primer لا يحل محله نكليوتيدات مما يحول دون إكمال طرفي سلسلة الدنا DNA. وبالنتيجة، يصبح الدنا DNA أقصر فأقصر في كل دورة تضاعف.

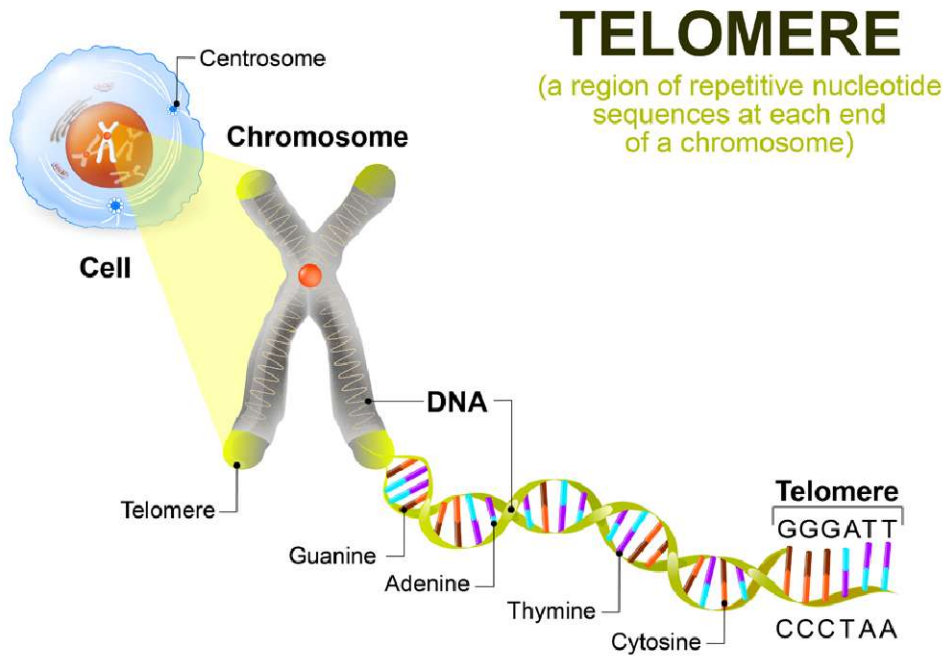


- حيث أن في التضاعف عند حقيقيات النوى، وبعد إزالة التسلسل البدئي من النهاية 5’ للسلسلة المتشكلة المتأخرة ، تحدث فجوة، فأحياناً لا يحل محل هذه التسلسلات نكليوتيدات أخرى، هذه الفجوة تجعل سلسلة الدنا المتشكلة معرَّضة للهجوم من قبل 5 Exonucleases.
- يتم التغلب على هذه المشكلة عم طريق التيلوميراز Telomerase، يقوم التيلوميراز بتصنيع التيلوميرات حيث أنه يحتوي على سلسلة من الـ RNA تحوي التسلسل AAUCCC يصفّ مقابلها DNA بالتسلسل TTAGGG.

❖ Telomerases:

هي قسيمات انتهائية تتوضع على نهاية الصبغي لحمايتها من أن تصبح متشابكة أو تتخرب أو أن تلتصق مع بعضها البعض.

- هي عبارة عن تسلسلات مكررة غير مرمزة في نهاية الصبغيات (الكروموزومات) وهذا يشكل غطاء ساتر لحماية نهاية الصبغي.
- يتقلص طول التيلوميرات مع كل تضاعف للـ DNA.
- تتكون التيلوميرات من تسلسل حمض نووي طرفي (متكرر من 100 إلى 1000 مرة) ويكون هذا التسلسل TTAGGG بالإضافة إلى البروتين.
- تسلسل التيلوميرات النموذجي غني بالغوانين والتايمين.
- تُفيد التيلوميرات كساعة زمنية لحساب عدد مرات تضاعف الحمض النووي.
- عندما تكون التيلوميرات قصيرة جداً تموت الخلية وهذا ما يعرف بالموت المبرمج ، وهذا يتحقق غالباً عند الوصول إلى ما يقارب الـ 50 انقسام للخلية.



ملاحظات:

- كلما كانت التيلوميرات أطول كلما كانت حياة الخلية أطول، لأنها توفر لها حظاً أوفراً للانقسام وهذا له دوره في علم الأورام حيث أن التحكم به يمكِّن من الحد من انقسام الخلية السرطانية وبالتالي من انتشار الورم.
- في الخلايا السرطانية والجذعية تكون التيلوميرات طويلة جداً وهذا مايجعلها تتضاعف عدداً كبيراً من المرات.